

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-316594

(P2000-316594A)

(43) 公開日 平成12年11月21日 (2000.11.21)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

データベース (参考)

C 1 2 P 21/00

C 1 2 P 21/00

A 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平11-130393

(22) 出願日 平成11年5月11日 (1999.5.11)

(71) 出願人 591106680

和研薬株式会社

京都府京都市左京区一乗寺西水干町17番地

(72) 発明者 遠藤 弥重太

愛媛県松山市朝美1丁目5番3号

(72) 発明者 西川 茂道

滋賀県草津市下笠町字辻出945番地1 和
研薬株式会社草津センター内

(74) 代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

Fターム (参考) 4B064 AC01 CA11 CA21 CC03 CD22
DA16

(54) 【発明の名称】 無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤、及び無細胞タンパク質合成反応用キット

(57) 【要約】

【課題】室温保存可能であって、該細胞抽出物の生物学的機能を維持した状態の製剤に調製された無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤の提供することが本発明の課題である。

【解決手段】本発明の解決手段は、生物体から、自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することによって調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を含む物質を凍結乾燥することからなる。

Best Available Copy

【特許請求の範囲】

【請求項1】生物体から、自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することによって調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を含む物質を、室温保存可能であって、該細胞抽出物の生物学的機能を維持した状態の製剤に調製されたことを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項2】製剤が、乾燥製剤である請求項1に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項3】製剤化が、凍結乾燥処理によっておこなわれる請求項2に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項4】細胞抽出物を利用した無細胞タンパク質合成系の合成系反応に不可欠な物質を添加、又は合成系反応に不可欠な物質と合成系反応の効率を高める物質を添加して製剤化をおこなうことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項5】合成系反応に不可欠な物質が、合成基質およびエネルギー源である請求項4に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項6】合成系反応の効率を高める物質が、カリウムイオン化合物、マグネシウムイオン化合物である請求項4に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項7】要時、水溶液への溶解性を容易化する物質を添加した請求項4～6のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項8】生物体が、胚芽である請求項1～7のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項9】自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除する方法が、非イオン性界面活性剤を用いて、胚芽抽出物を処理することを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項10】非イオン性界面活性剤を用いて、胚芽抽出物を処理する方法が、超音波処理により、洗浄液が白濁しなくなるまでおこなうことを特徴とする請求項9に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項11】胚芽が、コムギ、大麦、いね、コーン、およびほうれん草から選択される請求項8～10のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項12】自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系が、リボソーム不活性化タンパク質である請求項1～11のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項13】リボソーム不活性化タンパク質が、トリチンである請求項12に記載の無細胞タンパク質合成用

細胞抽出物含有製剤。

【請求項14】自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することが、リボソームの脱アデニン化を制御することである請求項1～11のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項15】自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除するために、リボソームの脱アデニン化を制御する物質を添加する請求項14に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項16】非イオン性界面活性剤と、リボソームの脱アデニン化を制御する物質を添加することによって胚芽を処理する請求項9～11のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

【請求項17】請求項1～16のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を調製することからなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の保存方法。

【請求項18】請求項1～16のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を含む無細胞タンパク質合成反応用キット。

【請求項19】請求項1～16のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤に水を添加することによって合成反応系の反応液組成を至適化できるように、翻訳鑄型を除いて調製されることを特徴とする鑄型依存的に作動する無細胞タンパク質合成反応用キット。

【請求項20】水、合成基質、エネルギー源、反応効率を高める物質から選ばれる化合物を、要時追加添加可能にセットされた請求項18に記載の無細胞タンパク質合成反応用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、無細胞タンパク質合成系に使用する細胞・組織からの調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤、及びこの製剤を含む無細胞タンパク質合成反応用キットに関するものである。本発明は、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を安定化し、室温保存・室温輸送を可能とした製剤及び該製剤を含むキットに関するものである。本発明は、要時、水の添加によって合成効率の高い鑄型依存的な無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を含むキットの提供に関するものである。

【0002】

【従来の技術】細胞内でおこなわれているタンパク質の合成反応は、まず遺伝情報をもつDNAからその情報がmRNAに転写され、そしてリボソームがそのmRNAの情報を翻訳して、タンパク質を合成するという工程で進行している。現在、この細胞内におけるタンパク質合成を試験管等の生体外で行う方法としては、例えばリボソームを生物体から抽出し、これらを用いて試験管内で

無細胞タンパク質合成法の研究が盛んに行われている（特開平6-98790、特開平6-225783、特開平7-194、特開平9-291、特開平7-147992）。この方法には、リボソームの原料として、大腸菌、胚芽、家兎網状赤血球などが用いられてきた。

【0003】これら無細胞タンパク質合成系に使用する無細胞タンパク質合成用細胞抽出液や翻訳鋳型を除いた他の合成基質やエネルギー源及び、各種イオン等、翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質を含む無細胞タンパク質合成反応液は常温では不安定であり、-80度摂氏以下の超低温でのみ安定な保存が可能であった。

【0004】無細胞タンパク質合成系は、ペプチド合成反応速度と翻訳反応の正確性において生細胞に匹敵する性能を保持し、かつ目的とするタンパク質を複雑な精製工程を実施することなく得ることができる有用な方法である。そのため、該合成系をより有用に産業上に適用するため、合成効率の向上に関するいくつかの発明が開示されてきた。しかし、産業上の有用性向上のためには、合成効率のみならず、合成系に使用する各種の物質を安定に高品質を保持して供給することが必要である。

【0005】

【解決しようとする課題】本発明の目的の一は、無細胞タンパク質合成系に必要な、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物、翻訳鋳型を除いた他の合成基質、エネルギー源及び、各種イオン等、翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質を含む無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を、常温下にあっても、安定であり、該製剤の生物学的機能を維持可能にする手段を提供することである。また、本発明の目的の別の一は、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を含むキットを安定に保存、供給することによって、無細胞タンパク質合成の作業工程を簡便化する手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】本発明者等は、上記課題を解決すべく検討を行なった結果、その手段の一として、調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、または無細胞タンパク質合成用細胞抽出物と無細胞タンパク質合成反応系に関与する物質に対して、凍結乾燥等の処理を導入し、乾燥製剤とすることにより、本発明を完成するに至った。

【0007】また、本発明の別の手段の一は、原料である無細胞タンパク質合成用細胞の自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することにより、本発明を完成するに至った。

【発明の実施の形態】

【0008】本発明の一手段である、原料である無細胞タンパク質合成用細胞の自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することとは、原料細胞自身が含有する又は保持する自己タンパク質の合成を制御する手

段を除くことを意味する。特に、本発明者が見出したこの関与する系を排除することとは、リボソームに作用してその機能を抑制する物質の排除を意味する。

【0009】原料細胞自身が含有する又は保持するタンパク質合成機能を抑制する物質とは、例えば種子の胚乳に大量に局在することが知られている、リボソームの機能を抑制するトリチン (Messiah, A. J., and Hartely, M. R. (1995) *Planta*, 197, 633-640)、チオニンとよばれるシステインを多く含むタンパク質 (Brummer, J., Thole, H. and Kloppsch, K. (1994) *Eur. J. Biochem.*, 219, 425-433)、リボヌクレアーゼ (Matsushita S., *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.*, No. 19, 1~) 等である。

【0010】胚芽の単離段階で混入する、胚乳局在性の胚芽無タンパク質合成抑制 (阻害) タンパク質の一群、たとえば、トリチン、チオニン、リボヌクレアーゼ等を完全に胚芽試料から排除することによって、タンパク質合成活性の抑制を解除することができる。

【0011】つまり本発明の手段の一は、無細胞タンパク質合成用の細胞・組織からの抽出液調製に際し、生体組織や細胞の損傷時に発動する自己タンパク質合成反応阻害機構、すなわち、生理的に備わった対病原自己防御機構としての自己タンパク質合成反応破壊機構を除去する技術、破碎に伴って誘起されるタンパク質合成反応阻害活性を中和する又は除去する技術によって、本発明の手段の一を達成する。

【0012】本発明の原料細胞は、無細胞タンパク質合成系に汎用されている胚芽、大腸菌、および網状赤血球やガン細胞等のほか、他の生物由来の無細胞タンパク質合成用細胞にも基本的に適応可能である。好ましい、態様としては、胚芽であり、コムギ・大麦・イネ・コーン・ほうれん草等が例示される。

【0013】これら原料細胞から、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の調製は、既に既知の各種方法 (Johnston, F. B. et al. (1957) *Nature*, 179, 160-161) と組合せておこなうことができる。本発明の手段の一である、自己タンパク質の合成を制御する手段を除くための有用な手段は、界面活性剤特に非イオン性の界面活性剤をもちいて原料細胞を処理することである。非イオン性の界面活性剤であるかぎり、広く利用ができるが、好適なものとしては、ポリオキシエチレン誘導体である、ブリッジ (Brigj)、トリトン (Triton)、ノニデット (Nonidet) P40、ツイーン (Tween) 等が例示される。なかでも、ノニデット (Nonidet) P40が最適である。これらの非イオン性界面活性剤は、たとえば0.5%の濃度で使用される。

【0014】処理は、原料細胞を、例えばコムギ胚芽を使った場合、既知の手段でミル・浮選・篩の工程によって、胚芽抽出物を回収する。この胚芽抽出物に対して、界面活性剤による洗浄を数回おこない、洗浄液が白濁しなくなるまで、洗浄を行う。この処理は、超音波処理との組合せでおこなうことがより好ましく、より完全な効果をうることができる。

【0015】本発明の別の手段は、このようにして調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の製剤的安定化手段を導入することである。従来、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の保存方法は、前記のように-80~-196度摂氏近辺であったことから、本発明製剤が室温保存可能な技術を達成したことは驚くべきことである。

【0016】無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の安定化の手段は、製剤を乾燥製剤特に凍結乾燥の手段により製剤化することである。凍結乾燥は、自体公知の方法を利用できるが、例えば液体窒素により急速に無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を凍結させる。乾燥は、例えば従来の凍結乾燥機を利用し3時間乾燥する。除水が完成し、得られた粉末状製剤は、真空又は窒素ガス雰囲気下で、封管され、製剤化がなされる。

【0017】前記製剤は、無論、前記本発明の手段が施された無細胞タンパク質合成用細胞抽出物単独で製剤化されてもよいが、所望により、無細胞タンパク質合成系に不可欠な物質、例えば合成基質、アミノ酸、エネルギー源等を選択して、添加後製剤化してもよい。

【0018】製剤は、さらに所望により、無細胞タンパク質合成系の反応効率を高める物質、例えば各種イオン化合物、好ましくはカリウムイオン化合物、マグネシウムイオン化合物等を添加することができる。

【0019】製剤は、さらに、溶解性を高める物質例えば界面活性剤、前記リボソームの脱アデニン化を防御する物質等を、所望により添加することができる。

【0020】製剤は、より好ましくは、無細胞タンパク質合成にあたって、単に水を添加することのみによって、反応の最適化が達成できる組成に調整されていることであるが、これは例えば製品をキット化することによって、要時混合して用いてもよい。無論、キット化にあたっては、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物単独、無細胞タンパク質合成系に不可欠な物質、無細胞タンパク質合成系の反応効率を高める物質、さらに反応の最適化に適当な水溶液等を、選択してセット化できる。

【実施例】

【0021】以下、本発明をコムギ胚芽を使用した無細胞タンパク質合成用細胞抽出製剤についての実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

【0022】

【実施例1】コムギ胚芽抽出液の調製

ミル、浮選、篩いを用いる種子から無傷（発芽能を有する）の単離方法はJohnstonらの方法（Johnston, F. B. et al. (1957) Nature, 179, 160-161）を改良して用いた。北海道産のチホクコムギ種子（未消毒）を1分間に100gの割合でミル（Fritsch社製Rotor Speed Mill pulverisette 14型）に添加し、回転数8,000rpmで種子を温和に破碎した。これを再度6,000rpmで破碎し、篩いで粗胚芽画分（メッシュサイズ0.71mm-1.00mm）を得た後、四塩化炭素とシクロヘキサン混液（四塩化炭素：シクロヘキサン=2.5：1）を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を浮上画分から回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した。この胚芽画分に混在する種皮等の不純物をポリエチレン板などの静電気帯電体を用いて吸着除去した。さらに胚芽粒子を篩と静電気帯電体を用いて、小粒（0.71mm-0.85mm）、中粒（0.85mm-1mm）、軽粒（0.85mm-1mmで且つ軽量）の3画分に分別した。小粒画分が最も高いタンパク質合成活性を示した。軽粒は、種子破碎時に胚芽に生じた小傷胚芽が浮選操作中に破壊が進行したものであると推察される。次に、この試料からコムギ胚乳成分を完全に除去するため、非イオン性界面活性剤であるNP40の0.5%溶液に懸濁し、超音波洗浄器を用いて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄を繰り返した。蒸留水の存在下に再度1回の超音波洗浄を行い、コムギ胚芽を純化した。

【0023】コムギ胚芽抽出液の調製は常法（Ericsson, A. H. et al. (1996) Meth. in Enzymol., 96, 38-50）に準じた。以下の操作は4度摂氏で行う。液体窒素で凍結した純化コムギ胚芽を乳鉢中で粉碎し、得た粉体1g当たり、1mlのPattersonらの方法を一部改変した抽出溶液（80mM HEPES-KOH, pH 7.8, 200mM 酢酸カリウム、2mM 酢酸マグネシウム、4mM 塩化カルシウム、8mM ジチオスレイトール、各0.6mM L型アミノ酸20種類、各1μMのタンパク質分解酵素阻害剤であるFUT、E-64、PMSFを含む）を加えて、泡が発生しないように注意しながら攪拌した。30,000g、15分間の遠心によって得られる上清を胚芽抽出液として回収し、あらかじめ溶液（40mM HEPES-KOH, pH 7.8, 100mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、4mM ジチオスレイトール）で平衡化しておいたセファデックスG-25カラム（Coarse）でゲル濾過を行った。試料の濃度を、170~250A260nm（A260/A280=1.5）に調製した。

【0024】

【実施例2】コムギ胚芽抽出物の製剤化

実施例1に記載した方法で得たコムギ胚芽抽出液を液体窒素で凍結後、通常の凍結乾燥機 (Labconco Freeze Dry System Freezone 4.5) を用いて3時間の運転で除水した。調製した粉末状の試料は、その成分が化学変化しないように2種の方法、真空及び窒素ガス充填下に封管して保存した。

【0025】

【実施例3】タンパク質合成効果の確認

上記の方法で凍結乾燥し製剤化した本発明からなるコムギ胚芽抽出物含有製剤を -80°C で2ヶ月間保存したものと、凍結乾燥していないコムギ胚芽抽出液を液体窒素中 (-196°C) で2ヶ月間保存したものとの、タンパク質合成活性の比較を行った。

【0026】各コムギ胚芽抽出物に、Ericksonらの方法に準じた成分組成である、30mM HEPES-KOH, pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウム、2.85mM ジチオスレイトール、0.5mg/ml クレアチンキナーゼ、1.2mM アデノシン三リン酸 (ATP)、0.25mM グアノシン三リン酸 (GTP)、16mM クレアチンリン酸、0.380mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3mM) を加えた。さらに、1,000units/ml リボヌクレアーゼ阻害剤 (RNasin) とNP-40 (終濃度0.05%) を添加した後、既に発明者が文献報告した方法 (Endo, Y. et al., (1992) J. Biotech., 25, 221-230) で調製したCAP付きジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase) mRNA (80 μg /ml 反応容量) と50 μCi (ml 反応容量当たり) の [^{14}C] -ロイシン (leucine) (166mCi/mmol) を添加し、タンパク質合成活性を [^{14}C] -ロイシンのタンパク質への取込を指標に測定した。反応は $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ で行った。

【0027】図1に示したように、凍結乾燥したコムギ抽出物含有製剤 (■—■) を室温 -80°C で2ヶ月間保存した後においても、従来の液体窒素保存 (□—□) と同等なタンパク質合成活性を保持していた。また、凍結乾燥後における保存温度について検討したところ、保存期間1ヶ月後におけるタンパク質合成活性で比較した場合、 -80°C (●—●) が最も安定であったが、 4°C (■—■) または室温 (□—□) での保存でも、タンパク質合成活性は十分に保持されていた (図2)。

【0028】すなわち、本発明の手段を適用して、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を、従来の保存温度より高い温度である -80°C ～室温で、高品質を維持しながら保存および供給することが可能である。

【0029】

【実施例4】無細胞タンパク質合成コムギ胚芽抽出物含有製剤の調製

反応液は、容量の20～60%の、参考例1に記載の方法で調製したコムギ胚芽抽出液を含み、上記Ericksonらの方法に準じた以下の成分組成である、30mM HEPES-KOH, pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウム、2.85mM ジチオスレイトール、0.5mg/ml クレアチンキナーゼ、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mM クレアチンリン酸、0.380mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3mM) を添加した後、液体窒素で凍結し、通常の凍結乾燥機で除水した。調製した粉末状の試料は、その成分が化学変化しないように真空または窒素ガス充填下に封管して保存した。

【0030】

【実施例5】タンパク質合成活性の測定

本発明からなる実施例4の方法で調製した無細胞タンパク質合成コムギ胚芽抽出物含有製剤を -80°C で2ヶ月間保存したものと、同期間液体窒素中 (-196°C) に保存したコムギ胚芽抽出液に実施例4に記したEricksonらの方法に準じた成分組成の物質を添加した無細胞タンパク質合成コムギ胚芽抽出液との、タンパク質合成活性を比較した。各溶液に、さらに1,000units/ml リボヌクレアーゼ阻害剤 (RNasin) とNP-40 (終濃度0.05%) を添加した後、タンパク質合成活性の測定を実施例3に記載した方法で行った。図3に示したように、本発明の凍結乾燥した無細胞タンパク質合成コムギ胚芽抽出物含有製剤 (□—□) は、従来法で調製した液体窒素保存 (■—■) したものと同等なタンパク質合成活性を保持していた。

【0031】すなわち、本発明の手段を適用することにより、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を含む製剤を、従来の保存温度より高い温度である -80°C ～室温で、高品質を維持しながら安定に保存、供給することができ、さらに無細胞タンパク質合成系の作業工程を簡便化する方法を提供することが可能である。

【0032】

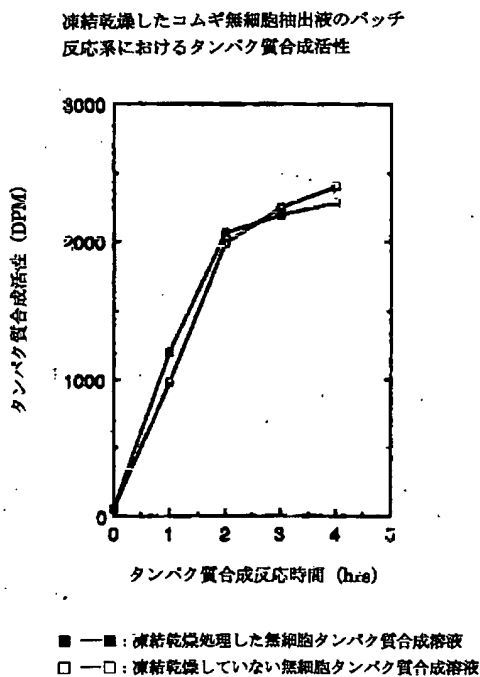
【発明の効果】本発明からなる製剤は、(1) 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の保存に超低温槽やドライアイス等を用いる低温輸送の必要無しに、長期にわたって高品質管理が可能となる。(2) 本発明からなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物とアミノ酸やATP等の合成基質、及び各種イオン等、翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質をあらかじめ混合して調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤をそのまま凍結乾燥することによって、タンパク質合成の高活性を有したままの形で容易に保存・輸送が可能である。本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製

剤質は、生体外でのタンパク質合成に当たって反応混液の調製を必要とせず、基本的には水と、目的とする翻訳鋳型 (mRNA) を添加するだけで、遺伝子産物の同定やその多量合成やその翻訳機構の解析が手軽にできる手段を提供するものである。

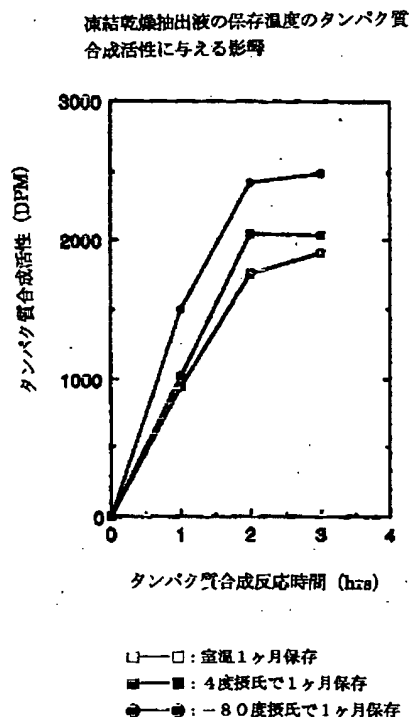
【0033】本発明により、無細胞タンパク質合成系に必要な、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物、翻訳鋳型を除いた他の合成基質やエネルギー源、及び各種イオン等、の翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質を含む、無細胞タンパク質合成反応系に参与する物質のように常温では不安定な物質を、安定に保存および供給することが可能になり、これらの物質を長期にわたって高品質管理することが可能になった。また、本発明の凍結乾燥した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を含む製剤を提供することにより、無細胞タンパク質合成系の取り扱いが従来より容易になり、さらに反応液を調製する必要がないため、作業工程が短縮され、該タンパク質合成系の産業上の有用性が向上した。

【図面の簡単な説明】

【図1】



【図2】



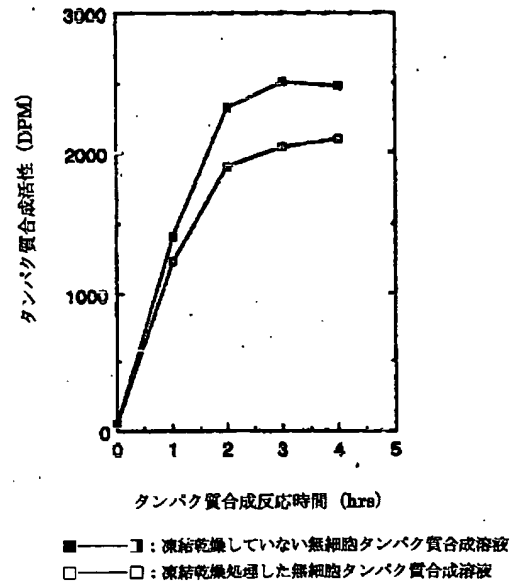
【図1】 凍結乾燥したコムギ胚芽抽出物を-80度摂氏で2ヶ月間保存したものと、凍結乾燥していないコムギ胚芽抽出液を液体窒素中で2ヶ月間保存したものとの、タンパク質合成活性を比較した図である。液体窒素中に従来法で2ヶ月間保存した抽出液 (□—□)、凍結乾燥後、同期間保存したもの (■—■)。縦軸はタンパク質に取り込まれた放射線 (DPM/5 μ l 当たりの反応液) を、横軸は26度摂氏における反応時間を示す。

【図2】 凍結乾燥抽出液の保存温度のタンパク質合成活性に与える影響を示した図である。室温1ヶ月間 (□—□)、4度摂氏で同期間 (■—■)、-80度摂氏で同期間 (●—●)。

【図3】 凍結乾燥したコムギ無細胞タンパク質合成溶液のバッチ反応系におけるタンパク質合成活性を示した図である。液体窒素中に従来法で2ヶ月間保存した抽出液 (■—■)、凍結乾燥後、同期間保存したもの (□—□)。

【図3】

凍結乾燥したコムギ無細胞タンパク質合成溶液の
バッチ反応系における活性の検討



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-316594

(43)Date of publication of application : 21.11.2000

(51)Int.Cl.

C12P 21/00

(21)Application number : 11-130393

(71)Applicant : WAKENYAKU KK

(22)Date of filing : 11.05.1999

(72)Inventor : ENDO YAETA

NISHIKAWA SHIGEMICHI

(54) CELL EXTRACT-CONTAINING PREPARATION FOR CELL-FREE SYNTHESIS OF PROTEIN, AND KIT FOR CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS REACTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject preparation which can be mixed with water and used, when needed, by removing a self-system related to the inhibition of the protein synthesis reaction from an organism, separating a cell extract used for the cell-free protein synthesis from the residue, and processing the obtained cell extract into the preparation which can be stored at room temperature.

SOLUTION: This cell extract-containing preparation for the cell-free synthesis of a protein is obtained by processing a cell extract for the cell free synthesis of the protein into the preparation in a state maintaining the biological functions of the cell extract. The cell extract for the cell-free synthesis of the protein is obtained by removing a system comprising, for example, a liposome-inactivating protein, tritin, related to the self-inhibition of a protein synthesis reaction from an organism (for example, embryo bud) by a method for treating the organism extract with a nonionic surfactant, or the like. The obtained cell extract- containing preparation for the cell-free synthesis of the protein can be preserved at room temperature by a lyophilization treatment or the like, can be stored in a high quality over a long period without requiring a low temperature transportation using an ultralow temperature tank, dry ice or the like, and can be used by the addition of water, when needed.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

06.10.2004

[Date of sending the examiner's decision of

17.05.2005

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's 2005-11124
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's 15.06.2005
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis characterized by what was prepared by the pharmaceutical preparation in the condition of room temperature preservation having been possible in the matter containing the cell extract for acellular protein synthesis prepared by eliminating the system which participates in inhibition of the protein synthesis reaction of self, and having maintained the biological functions of this cell extract from the organism.

[Claim 2] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 1 whose pharmaceutical preparation is desiccation pharmaceutical preparation.

[Claim 3] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 2 with which pharmaceutical preparation-ization is performed by freeze-drying processing.

[Claim 4] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 1 to 3 characterized by adding the matter which raises the effectiveness of the matter indispensable to addition or a synthetic system reaction, and a synthetic system reaction for the matter indispensable to the synthetic system reaction of the acellular protein synthesis system using a cell extract, and performing pharmaceutical preparation-ization.

[Claim 5] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 4 whose matter indispensable to a synthetic system reaction is a synthetic substrate and an energy source.

[Claim 6] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 4 whose matter which raises the effectiveness of a synthetic system reaction is a potassium ion compound and a magnesium ion compound.

[Claim 7] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 4 to 6 which added the matter which easy-izes solubility to a water solution at the time of an important point.

[Claim 8] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 1 to 7 whose organism is a germ.

[Claim 9] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 1 to 7 whose approach of eliminating the system which participates in inhibition of the protein synthesis reaction of self is characterized by processing a germ extract using a nonionic surfactant.

[Claim 10] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 9 whose method of processing a germ extract is characterized by carrying out until a penetrant remover stops becoming cloudy by sonication using a nonionic surfactant.

[Claim 11] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 8 to 10 with which a germ is chosen from wheat, barley, ****, a cone, and a spinach.

[Claim 12] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 1 to 11 whose system which participates in inhibition of the protein synthesis reaction of self is ribosome inactivation protein.

[Claim 13] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to

claim 12. whose ribosome inactivation protein is Tori Ching.

[Claim 14] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 1 to 11 that whose the system which participates in inhibition of the protein synthesis reaction of self is eliminated is controlling deadenine-ization of ribosome.

[Claim 15] Cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 14 which adds the matter which controls deadenine-ization of ribosome in order to eliminate the system which participates in inhibition of the protein synthesis reaction of self.

[Claim 16] A nonionic surfactant and cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 9 to 11 which processes a germ by adding the matter which controls deadenine-ization of ribosome.

[Claim 17] The store method of the cell extract for acellular protein synthesis which consists of preparing the cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 1 to 16.

[Claim 18] The kit for an acellular protein synthesis reaction including the cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 1 to 16.

[Claim 19] The kit for an acellular protein synthesis reaction which operates on the mold dependence target characterized by being prepared except for translation mold so that-izing of the reaction mixture presentation of the synthetic system of reaction can be carried out [optimum] to the cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis according to claim 1 to 16 by adding water.

[Claim 20] The kit for an acellular protein synthesis reaction according to claim 18 set possible [additional addition] at the time of an important point in the compound chosen from the matter which raises water, a synthetic substrate, an energy source, and reaction effectiveness.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis which is used for an acellular protein synthesis system and which was prepared from the cell and the organization, and the kit for an acellular protein synthesis reaction including this pharmaceutical preparation. This invention stabilizes the cell extract for acellular protein synthesis, and relates to a kit including the pharmaceutical preparation and this pharmaceutical preparation which enabled room temperature preservation and room temperature transport. this invention -- the time of an important point -- addition of water -- mold with high combined efficiency -- it is related with offer of a kit including the anacritic cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis.

[0002]

[Description of the Prior Art] The information is imprinted by mRNA from DNA which has genetic information first, and the proteinic synthetic reaction currently performed by intracellular is advancing at the process of ribosome translating the information on the mRNA and compounding protein. As an approach of performing protein synthesis in current and intracellular [this] out of living bodies, such as a test tube, ribosome is extracted from an organism, for example and research of an acellular protein synthesis method is briskly done within the test tube using these (JP,6-98790,A, JP,6-225783,A, JP,7-194,A, JP,9-291,A, JP,7-147992,A). Escherichia coli, a germ, rabbit reticulocyte, etc. have been used for this approach as a raw material of ribosome.

[0003] In ordinary temperature, the acellular protein synthesis reaction mixture containing chemicals which raise indispensable or this reaction effectiveness to a translation reaction, such as other synthetic substrate, energy source, various ion, etc. except the cell extract for acellular protein synthesis used for these acellular protein synthesis system or translation mold, was unstable, and preservation stable only at the ultra low temperature below -80-degree Centigrade was possible for it.

[0004] An acellular protein synthesis system is a useful method of holding the engine performance which is equal to a viable cell in a peptide synthesis reaction rate and the accuracy of a translation reaction, and obtaining target protein, without carrying out a complicated purification process. Therefore, in order to apply this synthetic system on industry more useful, some invention about improvement in combined efficiency has been indicated. However, for the improvement in usefulness on industry, it is required to hold high quality to stability and to supply to it various kinds of matter used not only for combined efficiency but for a synthetic system.

[0005]

[Problem(s) to be Solved] 1 of the object of this invention is offering the means which is stable and enables maintenance of the biological functions of this pharmaceutical preparation of the cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis containing chemicals which raise indispensable or this reaction effectiveness to a translation reaction, such as other synthetic substrates except the cell extract for acellular protein synthesis required for an acellular protein synthesis system,

and translation mold, an energy source, and various ion, even if it is under ordinary temperature. Moreover, 1 with the another object of this invention is offering a means facilitating the routing of acellular protein synthesis by saving and supplying a kit including the cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis to stability.

[Means for Solving the Problem]

[0006] this invention person etc. came to complete this invention by introducing processing of freeze drying etc. and considering as desiccation pharmaceutical preparation as 1 of the means to the prepared cell extract for acellular protein synthesis or the cell extract for acellular protein synthesis, and the matter which participates in the acellular protein synthesis system of reaction, as a result of inquiring that the above-mentioned technical problem should be solved.

[0007] Moreover, 1 of another means of this invention came to complete this invention by eliminating the system which participates in inhibition of the protein synthesis reaction of self of the cell for acellular protein synthesis which is a raw material.

[Embodiment of the Invention]

[0008] Eliminating the system which participates in the inhibition of the protein synthesis reaction of self of the cell for acellular protein synthesis which is a raw material which is a way stage of this invention means removing a means to control composition of the self-protein which the raw material cell itself contains or is held. Eliminating this system that this invention person found out especially and that involves means abatement of the matter which acts on ribosome and controls that function.

[0009] With the matter which controls the protein synthesis function which the raw material cell itself contains or is held For example, Tori Ching who controls the function of ribosome in which carrying out localization to a large quantity at the albumen of a seed is known (Massiah, A.J., and Hartely, M.R. (1995) *Planta*, 197,633-640), The protein containing many cysteines called the thionine (Brummer, J., Thole, H. and Kloppstech, K.(1994) *Eur.J.Biochem*, 219,425-433), It is RNase (MatsushitaS., *Mem.Res.Inst.Food Sci.Kyoto Univ.*, No.19, 1-) etc.

[0010] Control of protein synthesis activity can be canceled by eliminating thoroughly a group of the germ non-protein synthesis control (inhibition) protein of the albumen localization mixed in the isolation phase of a germ, for example, Tori Ching, the thionine, RNase, etc. from a germ sample.

[0011] That is, 1 of the means of this invention attains 1 of the means of this invention on the occasion of extract preparation from the cell and the organization for acellular protein synthesis with the technique remove the self-protein-synthesis reaction inhibition device exercised at the time of breakage on a body tissue or a cell, i.e., the self-protein-synthesis reaction destructive device as a pair pathogen self-defense mechanism equipped physiologically, and the technique neutralize or remove the protein-synthesis reaction inhibition activity by which induction is carried out with crushing.

[0012] The raw material cell of this invention can be fundamentally adapted also into the cell for acellular protein synthesis of the living thing origin of others and others which are the germ and *Escherichia coli* which are used widely by the acellular protein synthesis system, reticulocyte, a gun cell, etc. As a desirable mode, it is a germ and wheat, barley, a rice cone, a spinach, etc. are illustrated.

[0013] From these raw material cell, preparation of the cell extract for acellular protein synthesis can already be performed combining various known approaches (Johnston, F.B.et al.(1957) *Nature*, 179,160-161). The useful means for removing a means to control composition of the self-protein which is 1 of the means of this invention is having a surfactant, especially a nonionic surfactant, being and processing a raw material cell. Although utilization can be widely done as long as it is a nonionic surface active agent, as a suitable thing, the bridge (Brij) and triton (Triton) which are a polyoxyethylene derivative, Nonidet (Nonidet) P40, Tween (Tween), etc. are illustrated. Especially, Nonidet (Nonidet) P40 is the optimal. These nonionic surfactants are used by 0.5% of concentration.

[0014] Processing collects germ extracts according to the process of a mill, flotation, and a screen with a known means, when a wheat germ is used for a raw material cell. It washes until it performs washing by the surfactant several times and a penetrant remover stops becoming cloudy to this germ extract. As for this processing, it is more desirable to carry out in combination with sonication, and it can deal in more perfect effectiveness.

[0015] Another means of this invention is introducing the pharmaceutical preparation-stabilization means of the cell extract for acellular protein synthesis which carried out in this way and was prepared. Conventionally, it is a surprising thing that it attained the technique which this invention pharmaceutical preparation can room temperature save -80 - -196 degrees as mentioned above since the store method of the cell extract for acellular protein synthesis was the Centigrade neighborhood.

[0016] The means of stabilization of the cell extract for acellular protein synthesis is carrying out pharmaceutical preparation-ization for pharmaceutical preparation with the means of desiccation pharmaceutical preparation, especially freeze drying. freeze drying -- the very thing -- although a well-known approach can be used, the cell extract for acellular protein synthesis is quickly frozen, for example with liquid nitrogen. desiccation uses the freeze dryer since a connoisseur and dries it for 3 hours. Dewatering is completed, the sealed tube of the obtained powdered pharmaceutical preparation is carried out under a vacuum or nitrogen-gas-atmosphere mind, and pharmaceutical preparation-ization is made.

[0017] Although said pharmaceutical preparation may be pharmaceutical-preparation-ized of course by the cell extract independent for acellular protein synthesis to which the means of said this invention was given, it may choose and form the matter indispensable to an acellular protein synthesis system, for example, a synthetic substrate, amino acid, an energy source, etc. into after [addition] pharmaceutical preparation by request.

[0018] the matter to which pharmaceutical preparation raises the reaction effectiveness of an acellular protein synthesis system by request further, for example, various ion compounds, -- a potassium ion compound, a magnesium ion compound, etc. can be added preferably.

[0019] Pharmaceutical preparation can add further the matter, for example, a surface active agent, which raises solubility, the matter which defends deadenine-ization of said ribosome by request.

[0020] Although pharmaceutical preparation is adjusted to the presentation which can attain optimum-ization of a reaction only by only adding water in acellular protein synthesis more preferably, by kit-izing a product, it may mix at the time of an important point, and this may be used. Of course, in kit-izing, the cell extract independence for acellular protein synthesis, the matter indispensable to an acellular protein synthesis system, the matter that raises the reaction effectiveness of an acellular protein synthesis system, the still more suitable water solution for optimum-izing of a reaction, etc. are chosen, and-izing of them can be carried out [*****].

[Example]

[0021] Although the example about the cell extract pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis which used the wheat germ explains this invention still more concretely hereafter, the following example should not be wholly made an aid which acquires the concrete recognition about this invention, and the range of this invention is not limited at all by the following example.

[0022]

[Example 1] The isolation approach of flawlessness (it has germinating capacity) improved and used Johnston's and others approach (Johnston, F.B. et al. (1957) Nature, 179, 160-161) from the seed using the preparation mill of a wheat germ extract, flotation, and a sieve. The CHIHOKU wheat seed from Hokkaido (un-disinfecting) was added to the mill (Rotor Speed Mill pulverisette 14 mold made from Fritsch) at a rate of 100g in 1 minute, and the seed was mildly crushed by rotational frequency 8,000rpm. After crushing this by 6,000rpm again and obtaining a rough germ fraction (mesh-size 0.71mm-1.00mm) with a sieve, the flotation using a carbon tetrachloride and cyclohexane mixture (carbon tetrachloride: cyclohexane = 2.5:1) recovered the germ which has germinating capacity from the floatation fraction, and room temperature desiccation removed the organic solvent. Adsorption treatment of the impurities, such as a testa intermingled in this germ fraction, was carried out using the static electricity charged bodies, such as a polyethylene plate. Furthermore, the germ particle was classified using a screen and the static electricity charged body to three fractions of a granule (0.71mm - 0.85mm), an inside grain (0.85mm - 1mm), and **** (0.85mm - 1mm and light weight). Protein synthesis activity with the highest granule fraction was shown. The small blemish germ which produced **** in the germ at the time of seed crushing is guessed that destruction advances during flotation actuation. Next, in

order to remove a wheat germ milk component from this sample thoroughly, it suspended in 0.5% solution of NP40 which is a nonionic surfactant, and washing was repeated using the ultrasonic washer until a penetrant remover stopped having become cloudy. One ultrasonic cleaning was again performed to the bottom of existence of distilled water, and the wheat germ was purified.

[0023] Preparation of a wheat germ extract applied to the conventional method (Erickson, A.H. et al. (1996) Meth. in Enzymol., 96, 38-50) correspondingly. The following actuation is performed by Centigrade 4 times. Per [which ground in the mortar the purification wheat germ frozen with liquid nitrogen, and obtained it] 1g of fine particles, the extract solution (80mM HEPES-KOH, pH7.8, and 200mM potassium acetate --) which changed a part of 1ml Patterson's and others approach 2mM(s) Magnesium acetate, 4mM A calcium chloride, 8mM Dithiothreitol, 0.6 mM(s) each FUT, E-64, and PMSF which are 20 kinds of L type amino acid, and the protease inhibitor of 1microeach M -- containing -- in addition, it stirred, warning against generating a bubble. 30,000g and the supernatant liquid obtained by centrifugal [for 15 minutes] were collected as a germ extract, and G-sephadex 25 column (Coarse) which equilibrated beforehand with the solution (40mM HEPES-KOH, pH7.8, 100mM potassium acetate, 5mM magnesium acetate, 4mM dithiothreitol) performed gel filtration. The concentration of a sample was prepared to 170 to 250A260nm (A260/A280=1.5).

[0024]

[Example 2] The wheat germ extract obtained by the approach indicated in the pharmaceutical preparation-ized example 1 of a wheat germ extract was removed by operation of 3 hours after freezing using the usual freeze dryer (Labconc Freeze Dry System Freezone 4.5) with liquid nitrogen. Under two sorts of approaches, vacuums, and nitrogen gas charging, the sealed tube was carried out and the sample of the shape of prepared powder was saved so that the component might not change chemically.

[0025]

[Example 3] Protein synthesis activity of what saved the wheat germ extract content pharmaceutical preparation which consists of this invention freeze-dried and pharmaceutical-preparation-ized by the approach of the check above of the protein synthesis effectiveness for two months by Centigrade -80 degrees, and the thing which saved the wheat germ extract which is not freeze-dried for two months in liquid nitrogen (-196-degree Centigrade) was compared.

[0026] 30mM which is the component presentation which applied to each wheat germ extract correspondingly at Erickson's and others approach HEPES-KOH, pH7.6, 95mM Potassium acetate, 2.65mM Magnesium acetate, 2.85mM Dithiothreitol and 0.5mg/ml Creatine kinase, 1.2mM Adenosine triphosphate (ATP), 0.25mM A guanosine-3-phosphoric acid (GTP) and 16mM Creatine phosphate, 0.380mM Spermidine and 20 kinds of L type amino acid (0.3 mM(s) each) were added. Furthermore, 1,000 units/ml After adding the RNase inhibitor (RNasin) and NP-40 (0.05% of final concentration), The approach in which the artificer already did the reference report () [Endo,] [Y. et al., J.Biotech., 25, (1992) The dihydrofolic acid reductase with CAP prepared by 221-230 (dihydrofolate reductase) mRNA (80microg [/ml] reaction capacity) and a 50microcurie (per ml reaction capacity) [U-14C]-leucine (leucine) (166 mCi/mmol) are added. Taking in by the protein of a [U-14C]-leucine was measured for protein synthesis activity against the index. The reaction was performed at Centigrade 20 - 30 degrees.

[0027] As shown in drawing 1 , after saving the freeze-dried wheat extract content pharmaceutical preparation (** -- **) for two months by -80 room temperature Centigrade, protein synthesis activity equivalent to the conventional liquid nitrogen preservation (** -- **) was held. Moreover, -80 degrees, when the storage temperature after freeze drying was examined and the protein synthesis activity one month after a retention period compared, although Centigrade (- -- -) was the most stable, as for protein synthesis activity, preservation at Centigrade (** -- **) or a room temperature (** -- **) was also fully held 4 times (drawing 2).

[0028] That is, the means of this invention is applied and it is the -80-degree Centigrade which is temperature higher than the conventional storage temperature about the cell extract for acellular protein synthesis - a room temperature, and saving and supplying is possible, maintaining high quality.

[0029]

[Example 4] The preparation reaction mixture of acellular protein synthesis wheat germ extract content pharmaceutical preparation The wheat germ extract prepared by the approach of a publication is included in the example 1 of reference of 20 - 60% of capacity. 30mM which is the component presentation of the following according to the approach of Above Erickson HEPES-KOH, pH7.6, 95mM Potassium acetate, 2.65mM(s) Magnesium acetate, 2.85mM Dithiothreitol, 0.5mg/ml Creatine kinase, 1.2mM ATP, 0.25mM GTP, 16mM Creatine phosphate, 0.380mM After adding spermidine and 20 kinds of L type amino acid (0.3 mM(s) each), it froze with liquid nitrogen and water was removed with the usual freeze dryer. Under a vacuum or nitrogen gas charging, the sealed tube was carried out and the sample of the shape of prepared powder was saved so that the component might not change chemically. [0030]

[Example 5] Protein synthesis activity with the acellular protein synthesis wheat germ extract which added the matter of the component presentation according to Erickson's and others approach described in the wheat germ extract which saved in the liquid nitrogen between synchronizations (-196-degree Centigrade) as what saved the acellular protein synthesis wheat germ extract content pharmaceutical preparation prepared by the approach of the example 4 which consists of measurement this invention of protein synthesis activity for two months by Centigrade -80 degrees at the example 4 was compared. To each solution, it is further 1,000 units(es)/ml. After adding the RNase inhibitor (RNasin) and NP-40 (0.05% of final concentration), measurement of protein synthesis activity was performed by the approach indicated in the example 3. As shown in drawing 3, the acellular protein synthesis wheat germ extract content pharmaceutical preparation (** -- **) which this invention freeze-dried held protein synthesis activity equivalent to what prepared and carried out liquid nitrogen preservation (** -- **) with the conventional method.

[0031] That is, it is possible by applying the means of this invention to offer the approach of being the -80-degree Centigrade which is temperature higher than the conventional storage temperature about the pharmaceutical preparation containing the cell extract for acellular protein synthesis - a room temperature, and saving and supplying stability, maintaining high quality and facilitating the routing of an acellular protein synthesis system further.

[0032]

[Effect of the Invention] In the need for the refrigerated transport which uses a deep freezer, dry ice, etc. for preservation of the cell extract for (1) acellular protein synthesis, the good quality control of the pharmaceutical preparation which consists of this invention becomes nothing possible over a long period of time. (2) Preservation and transport are easily possible in a form [having had the high activity of protein synthesis] by freeze-drying the cell extract content pharmaceutical preparation for acellular protein synthesis which was mixed beforehand and prepared chemicals which raise indispensable or this reaction effectiveness to a translation reaction, such as synthetic substrates, such as the cell extract for acellular protein synthesis and amino acid which consist of this invention, and ATP, and various ion, as it is. The quality for acellular protein synthesis of this invention of cell extract content pharmaceutical preparation does not need preparation of a cocktail in the protein synthesis in the outside of a living body, but only adds fundamentally water and the translation mold (mRNA) made into the object, and offers the means which can perform easily identification and its abundant composition of a gene product, and analysis of the translator.

[0033] Like the matter which participates in the acellular protein synthesis system of reaction which contains the chemical which raises indispensable or this reaction effectiveness to the translation reaction of **, such as other synthetic substrates and energy source except the cell extract for acellular protein synthesis required for an acellular protein synthesis system, and translation mold, and various ion, by this invention, it became possible to save and supply the unstable matter to stability in ordinary temperature, and it became possible to carry out the good quality control of these matter over a long period of time. Moreover, since the handling of an acellular protein synthesis system did not need to become easy and did not need to prepare reaction mixture further from before by offering the pharmaceutical preparation containing the cell extract for acellular protein synthesis which this invention freeze-dried, the routing was shortened and the usefulness on the industry of this protein

synthesis system improved.

[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.